第15卷 第1期　　昆虫学报　　Vol. 15, No. 1
1966年2月　　ACTA ENTOMOLOGICA SINICA　　Feb., 1966

粘虫(*Leucania separata* Walker)氨基酸激活作用的初步研究*

翟启慧
(中国科学院动物研究所)

摘要　本工作利用羟胺反应的方法研究了粘虫氨基酸激活酶的一般特性和反应条件,组织间的分布,以及不同发育期的活力变化等问题。粘虫该酶的一般特性和反应条件一般与高等动物及微生物的差别不大。氨基酸激活作用受对氯汞苯甲酸的抑制,并受抗坏血酸和谷胱甘肽的活化,暗示酶的活性中心中可能包括巯基。氯霉素和维生素 B_{12} 对酶活力无明显的影响。

粘虫氨基酸激活酶只能激活 α-氨基酸的 L-异构体,对 D-异构体和 β-氨基酸均没有作用。它对二肽也有一定程度的激活作用,表明粘虫中小分子肽可能在蛋白质合成中直接被利用。

粘虫组织中各种氨基酸激活酶的活力不相同。在20种氨基酸中以激活半胱氨酸的酶活力最高,色氨酸和酪氨酸的激活率占第二位,其余的差异不很显著。天门冬酰胺和谷氨酰胺的激活率比相应的氨基酸高得多。

粘虫6龄幼虫各组织中氨基酸激活酶活力以脂肪体为最高,表皮肌肉与消化道次之,血淋巴最低。到老熟幼虫期,脂肪体中活力急剧下降,以表皮肌肉中活力为最高。

在蛹期,组织中氨基酸激活酶活力呈U形变化,在成虫期,酶活力的变化与生殖腺的发育和产卵有密切关系。

一、前　言

蛋白质的生物合成是在理论上和生产实践中具有重要意义的课题,因此是当前生物化学中进展迅速的领域之一。昆虫有机体的生长繁殖与蛋白质的生物合成有密切的关系。到目前为止,在昆虫中,关于蛋白质的合成问题只是在家蚕丝腺中研究得比较多,在其他昆虫的整体或个别组织中(如体液、脂肪体等),虽然也见到一些报导,但都只研究了蛋白质含量的增加或标记氨基酸的渗入作用,对于蛋白质生物合成过程中的每一个步骤,都还没有详细研究。蛋白质生物合成过程被认为包括四个主要步骤[1],有不同的酶系参加,反应机制比较复杂。氨基酸的渗入作用是蛋白质生物合成中若干主要反应的一种现象,可以作为蛋白质生物合成强度的一种指标。但是要深入了解从氨基酸形成肽链过程的机制,有必要对其中每一步骤进行详尽的研究。在昆虫中,对害虫的控制或对益虫的利用,常涉及生长和生殖的问题,这时需要对蛋白质生物合成的机制具有全面深入的了解。

---

* 本工作蒙钦俊德教授热情关怀和指导,并修改文稿;刘树森同志对文稿提出宝贵意见;谷成珍同志协助工作,特致谢忱。

本文采用以下简称: aa,氨基酸; ATP,腺三磷; E,激活酶; aa～AMP 氨酰腺苷; PP,焦磷酸; sRNA,可溶性核糖核酸; Tris,三羟甲基氨基甲烷; TCA,三氯乙酸; EDTA,乙二胺四乙酸。

1) 根据目前的资料,蛋白质生物合成的途径包括以下四个步骤: 1.氨基酸的激活—氨基酸通过激活酶的作用而被激活; 2.与 sRNA 的结合—作为中间受体的可溶性核糖核酸接受了激活的氨基酸; 3.肽链的形成—可溶性核糖核酸通过传递酶的作用将氨基酸传递给位于核糖核蛋白体上的信使核糖核酸(mRNA),使按一定的排列顺序连接成为肽链; 4.蛋白质分子的形成—通过释放酶的作用,肽链从核糖核蛋白体上脱下,并经过肽链的折迭、交叉和成型,最后形成完整的蛋白质分子(王德宝, 1962)。

我们的工作就是从这样的考虑出发的。

氨基酸的激活作用是蛋白质生物合成的第一个步骤，游离氨基酸上的羧基必须通过酶的作用而被激活，才能和其他氨基酸的氨基结合成为肽链。氨基酸激活作用的反应机制是 Hoagland (1955) 在大鼠肝脏的研究中首先发现的。他在该组织的上清液中发现有催化氨基酸羧基活化的酶的存在，当用酸调节其 pH 到 5 的时候，就有具有激活酶活力的蛋白质析出，因此，氨基酸激活酶被称为“pH 5 酶”。氨基酸激活作用的反应机制如下:

$$aa + ATP + E \rightleftharpoons aa \sim AMP - E + PP$$

氨基酸和 AMP 所形成的氨酰腺苷和酶结合得很紧，游离状态的氨酰腺苷在正常情况下是不存在的。游离的氨酰腺苷很容易和氨基酸形成肽链，因此，只有在氨酰腺苷不能随意反应的情况下，才能保证形成一定结构的蛋白质分子。

在昆虫中有关氨基酸激活作用的研究很少。Heller 等(1959) 曾经研究了家蚕丝腺和血淋巴的氨基酸激活作用，及其与丝蛋白合成的关系。他们发现，各种氨基酸的激活率很不相同，它们和蛋白质中各种氨基酸的含量无关。Finch 和 Birt (1962)研究了绿蝇 *Lucilia cuprina* 蛹期的氨基酸激活作用，发现激活酶的活力随成虫组织的生长而增高。Matsuzaki (1963)研究了家蚕后丝腺中标记氨基酸与 sRNA 的结合，Howells 和 Birt (1964) 又详细地研究了绿蝇发育过程中的氨基酸激活作用。

二、材料和方法

实验材料系室内饲养的粘虫。氨基酸激活酶的制备与测定方法如下:

将一定发育阶段的粘虫整体或个别组织称取鲜重后，加一定体积的 0.9% KCl 溶液，在冰浴中和石英砂一起磨成匀浆。离心后弃去沉淀，将上清液的 pH 调节至 5，使具有激活酶活力的蛋白质析出。离心后将沉淀溶于一定量的 Tris-HCl 缓冲液 (pH = 7.0) 中，得到氨基酸激活酶的制备物。反应溶液含有(以微克分子计): L-氨基酸 (20 种普通氨基酸的等浓度混合物), 40; ATP, 10; $MgCl_2$, 20; Tris-HCl 缓冲液 (pH = 7.0), 100; 羟胺 ($NH_2OH \cdot HCl$ 溶液于使用前用 KOH 中和), 3000; 酶制备物, 0.5 毫升 (5—10 毫克蛋白质)。总体积为 2.5 毫升。保温条件为 37℃ 1 小时，以不加底物 (L-氨基酸以 Tris-HCl 缓冲液代替之)的反应系统作为对照。保温完毕加 3 毫升酸性三氯化铁试剂 (10% $FeCl_3$, 5% TCA 在 0.66 *N*HCl 中)，滤去沉淀，然后在 540mμ 比色。标准曲线是用合成的甘氨酰氧肟酸 (glycine hydroxamate) (Safir & Williams, 1952)制成的。

上述的测定氨基酸激活酶的方法，其反应原理如下:

$$aa + ATP + E \rightleftharpoons aa \sim AMP - E + PP$$

$$aa \sim AMP - E + NH_2OH \longrightarrow aa - NHOH + AMP + E$$

$$3aa - NHOH + FeCl_3 \longrightarrow 3HCl + Fe(aa - NHO)_3$$

氨酰腺苷与酶的复合体可以和高浓度的羟胺发生反应，其反应产物 (氨酰氧肟酸) 和铁离子起颜色反应，颜色的深浅与复合体的量成正比。

酶活力单位为微克分子氧肟酸/克鲜重/小时。比活力单位为微克分子氧肟酸/毫克蛋白质/小时。

酶液蛋白质含量用 Lowry 等(1951)的方法测定。

三、結　　果

1. 粘虫氨基酸激活酶的最适反应条件

首先，我们确定了粘虫氨基酸激活酶的反应系统应包括 ATP、Mg^{++}、缓冲液、底物、羟胺及酶的制备物。从完全系统中减去任何一种物质，反应都受到不同程度的影响（表 1）。

表 1　粘虫氨基酸激活酶從反应系統中减去个别成分后对活性的影响

反应系统	比活力
完全系统	2.80
完全系统-ATP	1.33
完全系统-Mg^{++}	1.60
完全系统-L-氨基酸	1.28
完全系统-羟胺	0.60
完全系统-酶液	0.33

反应系统：L-氨基酸 40 微克分子
ATP 10 微克分子
$MgCl_2$ 20 微克分子
Tris 100 微克分子
NH_2OH 3000 微克分子
酶蛋白 5—10 毫克

其次，我们利用 Tris-马来酸缓冲液，测定了粘虫氨基酸激活酶在 pH 5.2—8.6 的范围內的活力，发现粘虫氨基酸激活酶的反应最适 pH 在 6.8—7.2 之间（图 1），低于高等动物中该酶的最适 pH (7.5—7.8) (Hoagland, 1955; Davie 等，1956; Schweet & Allen, 1958)。

在 37℃ 中，在 2 小时內酶活力与反应时间成直线关系。超过 2 小时以后，反应速度下降(图 2)。

此外，为了选择反应系统中各物质的最适浓度，我们进行了一系列的实验，分别测定了酶活力与各物质浓度的关系。

(1) 酶活力与底物浓度的关系　在不加底物的情况下，氨基酸激活反应也能进行，表明酶液中含有內源氨基酸。当底物浓度小于 10 微克

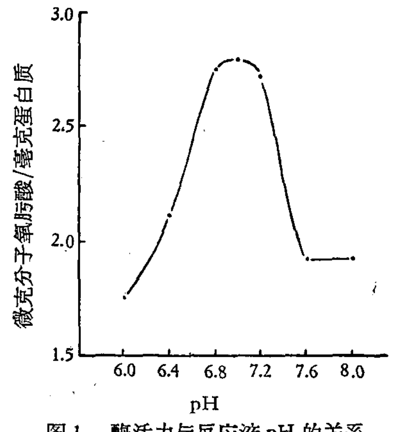




图 1　酶活力与反应液 pH 的关系

微克分子氧肟酸/毫克蛋白质
3.5
2.5
1.5
30 60 90 120 150 180
作用时间(分钟)

图 2　酶活力与反应时间的关系

分子/毫升时，酶活力在很大程度上受底物浓度的限制，底物增加，酶活力也增加。但当浓度增加到 20 微克分子/毫升以上时，酶活力增加极微（图 3）。

(2) 酶活力与 ATP 浓度的关系　氨基酸激活反应需要能量供应。当反应系统中不加 ATP 时，反应也能进行，说明我们的酶液中可能有产生 ATP 的系统。根据测定结果来看，ATP 的最适浓度为 5 微克分子/毫升，超过此浓度对酶活力反而略有抑制作用(图 4)。

(3) 酶活力与 Mg^{++} 浓度的关系　根据实验结果看来，反应系统中不加 Mg^{++} 时，反应也能进行，表明酶液中含有反应所需要的 Mg^{++}。当外加的 Mg^{++} 浓度小于 10 微克分子/毫升时，酶活力随 Mg^{++} 浓度的增加而增加；当 Mg^{++} 浓度增加到 10 微克分子/毫升以上时，酶活力不再增加（图 5）。

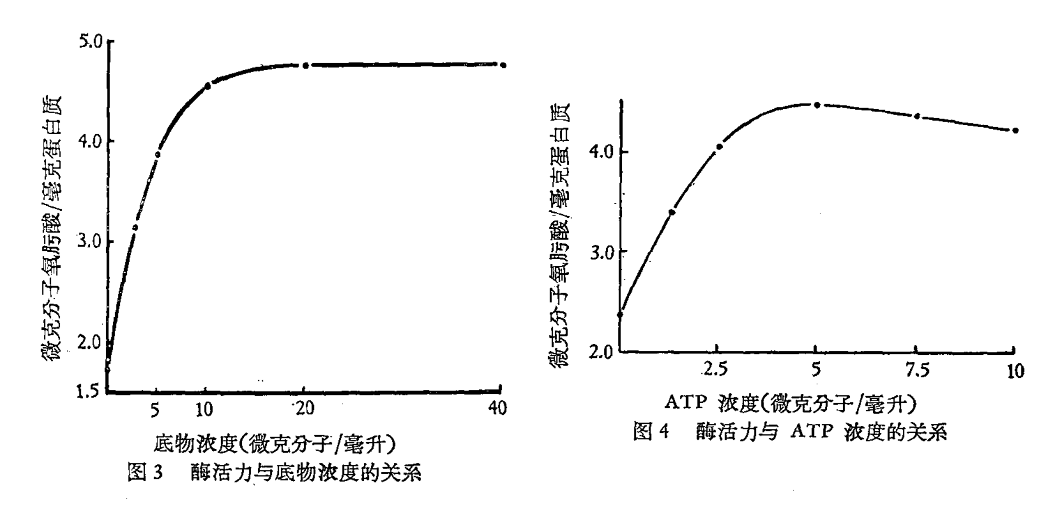


图 3　酶活力与底物浓度的关系

图 4　酶活力与 ATP 浓度的关系

（4）酶活力与羟胺浓度的关系　从实验结果可以看到，所测出的酶活力在很大程度上依赖于反应系统中羟胺的浓度（图 6）。

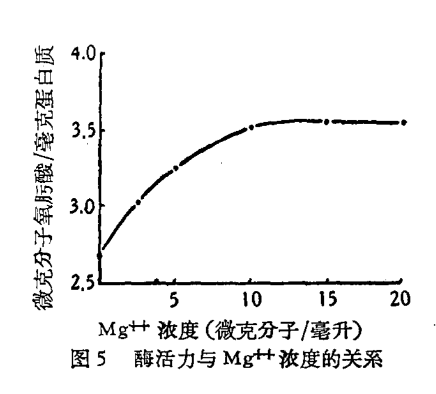


图 5　酶活力与 Mg^{++} 浓度的关系

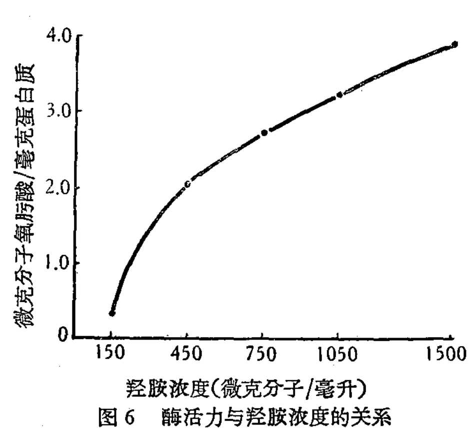


图 6　酶活力与羟胺浓度的关系

（5）酶活力与酶液浓度的关系　酶活力与反应系统中酶的浓度成直线关系（图 7）。

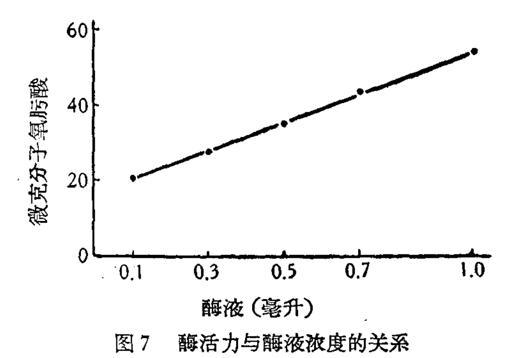


图 7　酶活力与酶液浓度的关系

根据上述结果，我们确定了方法中所述的测定粘虫氨基酸激活酶的条件。

2. 金属离子、还原剂、氯霉素及维生素 B_{12} 对粘虫氨基酸激活酶的影响

在高等动物中，如果反应系统中不加 Mg^{++}，氨基酸激活反应几乎不能进行；同样，反应系统中加了二价金属离子络合剂 EDTA，对酶活力有明显的抑制作用。在粘虫中，我们发现，激活反应对于 Mg^{++} 的依赖性不象高等动物中那么明显，而且反应系统中加 EDTA 对于反应反而稍有促进作用。在微生物中，曾有人报导氨基酸激活反应需要 Mn^{++}，但不需要 Mg^{++} (Шмерлинг и Басс, 1962)。因此，我们试验了除 Mg^{++} 以外的 8 种二价离子对粘虫激活酶的作用。

实验结果发现，不论反应系统中加不加 Mg^{++}，Cu^{++} 都有明显的促进作用。其他离子

当反应系统中有 Mg^{++} 时，也都有些促进作用，但是当单独存在时，它们反而稍有抑制作用。

如果酶液经过透析，把内源的金属离子去掉，然后单独加入这些离子，发现 Cu^{++} 反有明显的抑制作用，Co^{++} 有促进作用，而其他的离子都几乎沒有作用(表 2)。

除了二价离子外，还试验了 K^+ 的作用。结果表明，K^+ 对酶活力有十分显著的促进作用，特别是与 Mg^{++} 同时存在时，促进作用更大。

表 2　金属离子与还原剂对酶活力的影响

金属离子(或还原剂)	最后浓度 (mM)	相对酶活力		
		I	II	III
Zn^{++}	8	114	92	100
Cd^{++}	8	116	85	99
Mn^{++}	8	127	82	99
Ni^{++}	8	128	90	100
Ba^{++}	8	130	90	96
Ca^{++}	8	130	98	94
Co^{++}	8	133	100	148
Cu^{++}	8	175	181	52
K^+	8	228	185	144
抗坏血酸	8	840	940	808
谷胱甘肽	8	150	—	150

I——酶液未透析，反应系统中加 Mg^{++}。
II——酶液未透析，反应系统中不加 Mg^{++}。
III——酶液对水透析，反应系统中不加 Mg^{++}。

从表 2 的结果中还可以看到，抗坏血酸和谷胱甘肽这两种还原剂对酶活力均有显著的促进作用。

当反应系统中加入氯霉素时，酶活力略无变化（表 3），表明氯霉素对粘虫氨基酸激活酶沒有抑制作用。将维生素 B_{12} 加入保温溶液，氨基酸的激活反应沒有很明显的改变（表 4）。

表 3　氯霉素对粘虫氨基酸激活酶的影响

氯霉素浓度 μg/ml	相对活力
0	100
25	106
50	106
100	105

表 4　維生素 B_{12} 对粘虫氨基酸激活酶的影响

维生素 B_{12} 浓度 μg/ml	比活力
0	1.65
40	1.70
80	1.60

3. 粘虫氨基酸激活酶的底物专一性

氨基酸激活酶对 L-氨基酸的高度专一性是早已确定的事实，但是后来有人在细菌中也发现了专门激活 D-氨基酸的酶 (Stulberg & Novelli, 1962a)。我们的试验结果证明，粘虫的氨基酸激活酶只能激活 L-氨基酸，对 D-异构体是沒有作用的。当两种异构体同时存在时，D-异构体对 L-氨基酸的激活反应有一定程度的抑制作用。此外，粘虫的氨基酸激活酶只激活 α-氨基酸，对 β-氨基酸也沒有作用(表 5)。

除了氨基酸以外，我们用 6 种二肽作底物，分别进行保温，可以测出微弱的激活反应。用这 6 种二肽的混合溶液作为底物时，激活反应较为显著（表 5、表 6）。

表 5 粘虫氨基酸激活酶的底物专一性

底物	最终浓度 mM	比活力
L-α-丙氨酸	16	0.23
D-α-丙氨酸	16	0
β-丙氨酸	16	0
L-苯丙氨酸	16	0.37
DL-苯丙氨酸	L-异构体 16 D-异构体 16	0.29
L-缬氨酸	16	0.33
DL-缬氨酸	L-异构体 16 D-异构体 16	0.27
混合氨基酸	L-异构体 16 D-异构体 6	1.00
混合氨基酸	L-异构体 16 D-异构体 12	0.31
混合 L-氨基酸	16	1.51
混合二肽	16	0.20

表 6 粘虫氨基酸激活酶对二肽的作用

底物	最后浓度 mM	比活力
混合 L-氨基酸	16	1.51
混合二肽	16	0.20
甘氨酰丙氨酸	16	0.10
亮氨酰甘氨酸	16	0.10
丙氨酰甘氨酸	16	0.06
甘氨酰苯丙氨酸	16	0.02
甘氨酰甘氨酸	16	0.02
甘氨酰亮氨酸	16	0.01

4. 粘虫组织中各种氨基酸激活酶活力的比较

每一种氨基酸各有其特异的激活酶，在细胞中存在着各种氨基酸的激活酶。我们用 20 种氨基酸和 2 种酰胺作为底物，分别与粘虫组织中制备出来的激活酶进行保温，测定了各种激活酶的活力。结果发现，各种激活酶的活力很不相同，其中 2 种酰胺的激活反应最強。在 20 种氨基酸中，以半胱氨酸的激活反应为最強，色氨酸、酪氨酸的反应也较強，甘氨酸、缬氨酸、脯氨酸、羟脯氨酸的反应较弱，丙氨酸的反应为最弱（表 7）。出现这些差异的可能原因，将在后面讨论。

表 7 粘虫組織內各种氨基酸激活酶的活力

底物[1]	比活力	底物	比活力
混合氨基酸	1.81	L-苏氨酸	0.34
L-天门冬酰胺	14.54	L-蛋氨酸	0.33
L-谷氨酰胺	8.75	L-颖氨酸	0.33
L-半胱氨酸	1.46	DL-异亮氨酸	0.33
L-色氨酸	0.60	L-亮氨酸	0.30
L-酪氨酸	0.53	L-精氨酸	0.29
L-胱氨酸	0.39	甘氨酸	0.27
L-谷氨酸	0.37	L-缬氨酸	0.26
L-天门冬氨酸	0.37	L-脯氨酸	0.25
L-丝氨酸	0.37	L-羟脯氨酸	0.25
L-苯丙氨酸	0.37	L-α-丙氨酸	0.23
L-组氨酸	0.34		

1）底物最后浓度为 16mM 的 L-异构体

5. 粘虫幼虫各组织中氨基酸激活酶的分布

我们以粘虫 6 龄幼虫为材料，测定了几种不同组织中氨基酸激活酶的分布情况。在

6 龄前期，脂肪体中酶活力最高，表皮肌肉次之，消化道又次之，血淋巴最低。到 6 龄后期，脂肪体中酶活力虽显著下降，但在这几种组织中其活力仍占第一位，表明脂肪体在蛋白质合成中的重要地位。到了老熟幼虫期，酶活力以表皮肌肉中为最高，消化道和脂肪体次之，血淋巴最低。在老熟幼虫中，表皮肌肉仍保持着较高的酶活力，这一事实可能与化蛹及蛹壳的形成有一定的关系。从 6 龄前期到老熟幼虫期，各组织中酶活力的变化趋势相同，都是下降的，其中以脂肪体中酶活力下降最为急剧，血淋巴中的变化最不显著（图 8）。

6. 粘虫不同发育期氨基酸激活酶活力的变化

我们测定了从老熟幼虫到成虫期各阶段整体组织中氨基酸激活酶活力的变化。结果发现，在预蛹期酶活力下降，化蛹后又恢复到老熟幼虫期的水平。在蛹的前半期随着幼虫组织的分解，酶活力逐渐下降，到后半期即成虫组织形成的阶段，酶活力显著增高。将羽化前酶活力又稍下降，刚羽化时急剧升高，但又很快下降，到后期又有明显的升高（图 9）。

从雌雄两性的差异来看，在老熟幼虫、预蛹及蛹的绝大部分时期中，雌雄两性的变化趋势相同，雌虫的酶活力比雄虫高。到了蛹的末期即将羽化以前，雄虫酶活力超过雌虫。在成虫期，雄蛾的酶活力均显著地高于雌蛾。

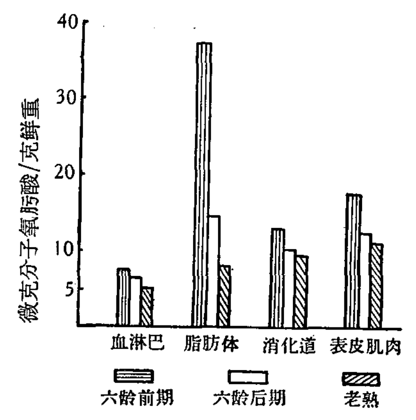


图 8　粘虫幼虫各组织中氨基酸激活酶的分布

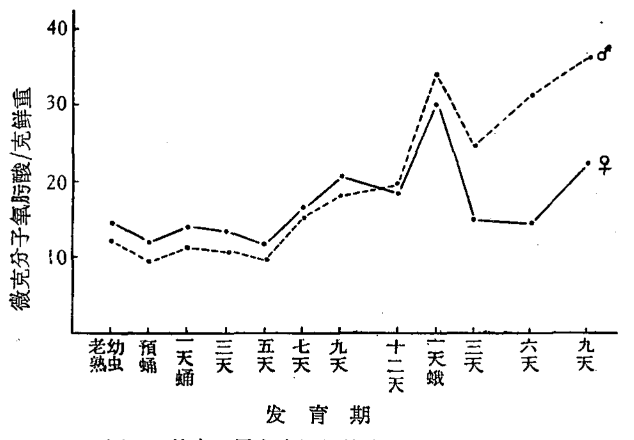


图 9　粘虫不同发育期氨基酸激活酶活力变化

每毫克蛋白质的比活力在各发育期的变化情况如下：从老熟幼虫到预蛹有显著下降，化蛹后略为升高，蛹的前半期逐渐下降，以后逐渐上升，到羽化前又有明显的下降。羽化后则不断上升，到成虫后期又复下降。在蛹期第五天以前，雌虫酶活力高于雄虫，以后各阶段雄虫均超过雌虫（图 10）。

因此总的说来，在蛹期，组织中氨基酸激活酶的活力和比活力均呈 U 形变化，这显然和变态有密切关系。成虫期比活力开始不断上升，而最后又下降，这可能和生殖有一定关系，特别是在雌蛾中，当卵细胞逐渐发育成熟时，比活力不断上升，过了产卵盛期之后，比活力急速下降。按单位鲜重计算的酶活力，在成虫期呈 U 形变化，这可能由于生殖腺发育，体内其他成分累积，体重增加，因此单位体重中的酶活力相对减低。

在蛹期对二肽的激活作用所显示的变动情况，与同时期氨基酸激活反应的情况是一致的（图 11）。

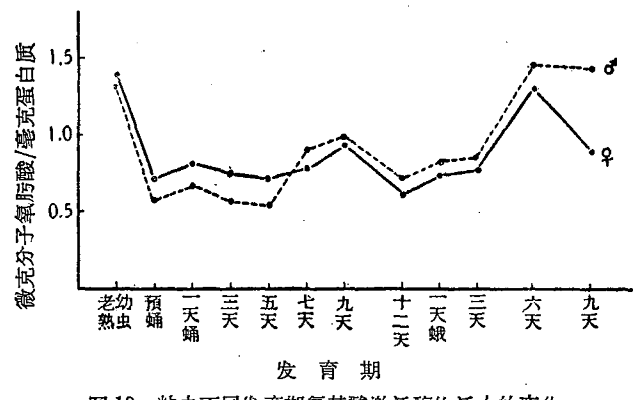


图 10 粘虫不同发育期氨基酸激活酶比活力的变化

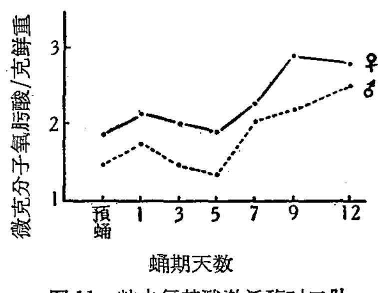


图 11 粘虫氨基酸激活酶对二肽的激活作用

四、討 論

1. 关于氨基酸激活酶的测定方法

到目前为止，测定氨基酸激活酶的方法已有好几种。除了羟胺反应以外，还有 PP-ATP 交换反应、AMP-ATP 交换反应 (Stulberg & Novelli, 1962b)，以及层析和电泳等方法(Elliott & Coleman, 1962; Loftfield & Eigner, 1959)。我们采用的羟胺反应这种测定方法，虽是最常用的方法之一，但其专一性并不是很高。与羟胺反应生成氧肟酸也可能发生在除氨基酸激活以外的其他代谢反应中。要用这种方法测定氨基酸激活酶只能依赖于加和不加底物的差数，而这样所得到的结果可能会有误差。假如激活酶已经部分地或完全地被內源氨基酸所饱和，那么加和不加底物的差数就不明显或根本沒有。所以，测不出激活反应可能是由于酶被內源底物所饱和，而不是由于酶不存在。但是由于激活酶的不稳定性，用透析或其他提纯方法来除去內源底物，会有较大的损失。在我们的试验中，如将激活酶的沉淀用 0.9% KCl 洗一次，卽在第二次离心后倒去上清液，沉淀中加 0.9% KCl 搅匀，将 pH 调至 5，重新离心，所得沉淀溶于缓冲液中制成酶液，一般可使內源底物全部除去。在本工作中，凡需要除去內源底物时，我们卽采用这种处理方法。

前面已经看到，氨基酸激活反应中生成 PP，由于反应的可逆性，PP 的积累将会阻碍激活反应的顺利进行，因此就有必要在反应系统中加入 PP 酶，使生成的 PP 不能积累。不少作者曾经报导利用羟胺反应测定氨基酸激活酶时必须要加入 PP 酶(Davie 等, 1956; Webster, 1959; Szafranski & Sulkowski, 1959)。在我们制备的酶液中，曾用 $Na_2P_2O_7$ 为底物进行了测定，证明有一定程度的 PP 酶活力，足以保证反应的顺利进行。所以我们在反应系统中沒有加入 PP 酶。

2. 关于粘虫氨基酸激活酶的性质

到目前为止，关于氨基酸激活酶的结构还不很清楚。有人认为它们的活性中心可能含有一个巯基 (Chantrenne, 1961)。从高等动物胰脏所制备出来的色氨酸激活酶，受对氯汞苯甲酸的抑制(对氯汞苯甲酸与巯基生成硫醇盐，它是检验巯酶的一种常用试剂)，虽然一些—SH 化合物对它沒有作用(Davie 等, 1956)。在我们的实验中，抗坏血酸和谷胱甘肽这两种还原剂对粘虫氨基酸激活酶有明显的活化作用，这表明酶分子中可能含有象巯基之类的还原性基团。此外，我们也观察到对氯汞苯甲酸对粘虫氨基酸激活酶的抑制作用。

根据这些结果，可以认为粘虫氨基酸激活酶的活性中心可能包括巯基。

3. 关于氯霉素及维生素 B_{12} 的作用

氯霉素对蛋白质的生物合成有抑制作用，在微生物的研究中早已有过许多报导（Гулый, 1963）。而且，已经明确，这种抗菌素仅仅抑制蛋白质合成的较后阶段，对氨基酸激活这一步是沒有影响的（Allfrey & Mirsky, 1960; Hierowski & Stolzman, 1961）。从我们的实验结果看来，氯霉素对粘虫的氨基酸激活反应确实沒有抑制作用。因此，在蛋白质合成的研究中，如果需要使反应停止在氨基酸激活的阶段，而不再继续进行下去，那么，氯霉素这种抗菌素将是一种比较理想的试剂。

维生素 B_{12} 与蛋白质合成的关系还是一个未完全明确的问题。 Wagle 等人曾进行一系列工作（见 Simkin, 1959 及 Coates & Porter, 1959 的综述），发现在缺乏维生素 B_{12} 的动物组织中，^{14}C-氨基酸渗入蛋白质的速度大大降低，在这样的系统中加入 B_{12} 可以使蛋白质合成的強度恢复到正常水平。正常系统中加入 B_{12} 对蛋白质合成也稍有促进作用。他们将 ^{60}Co-维生素 B_{12} 注射到动物体內，经过分析发现细胞上清液中大部分的标记是在“pH5 酶”中，因而认为 B_{12} 是氨基酸激活酶的一种辅助因子。但是他们的结果未能被别人所重复。因此，较多的作者认为 B_{12} 对蛋白质合成的作用可能只是间接的（Szafranski 等，1960）。我们在粘虫中也证明了 B_{12} 对氨基酸激活酶并沒有直接作用。至于 B_{12} 对蛋白质合成中其他步骤的影响如何，则还需要进一步研究。

4. 关于氨基酸激活酶对二肽的激活

在微生物中曾有人报导某些二肽（如 L-亮氨酰 L-酪氨酸、甘氨酰-L-亮氨酸）可以同样被激活（Chantrenne, 1961），而且还发现 ^{14}C 标记的肽可以和 sRNA 结合起来（Koningsberger, 1960）。但是也有人认为对二肽的激活可能是当肽分解成为氨基酸之后才进行的（Мосолов 等，1963）。因此，氨基酸激活酶能否直接激活二肽的问题，还不是十分肯定的。

在家蚕和柞蚕中，有人认为在变态期幼虫组织分解和成虫组织合成时，蛋白质的“改造”可能主要不是通过游离氨基酸的途径，而是通过小分子肽（Филиппович и Никитина, 1964）。我们的实验结果表明，在粘虫中氨基酸激活酶对二肽有一定程度的激活。考虑到昆虫生长发育迅速，特别是变态期组织变化急剧，生殖力強等等特点，为了适应蛋白质迅速合成的特殊需要，在昆虫中小分子肽能够在蛋白质合成中直接被利用的可能性是完全存在的。

5. 关于各种氨基酸激活酶的活力

从我们的实验结果可以看到，各种氨基酸激活酶的活力很不相同。我们认为，出现这些差异的原因可能是由于：1）在蛋白质合成中的实际需要不同；2）各种激活酶的稳定性不同；3）某些激活酶已经部分地被內源底物所饱和。

在 20 种氨基酸中，以半胱氨酸的激活反应为最強。当然，这可能因为其激活酶的活力确是比较高。但是，由于半胱氨酸是一种 —SH 化合物，因此，在作为底物的同时，它可能还起巯酶保护剂的作用。

谷氨酸和谷氨酰胺的化学结构比较相近，天门冬氨酸和天门冬酰胺也是如此。它们究竟是被同一种酶激活，还是分别被两种不同的酶激活呢？Howells 和 Birt（1964）利用 ^{32}PP-ATP 交换反应的方法，证明谷氨酸和谷氨酰胺是由同一种酶激活的，而天门冬氨酸

表 8 谷氨酸、谷氨酰胺、天門冬氨酸及天門冬酰胺的激活反应

底 物	比 活 力
L-谷氨酸	0.5
L-谷氨酰胺	6.5
L-谷氨酸+L-谷氨酰胺	8.4
L-天门冬氨酸	0.3
L-天门冬酰胺	13.5
L-天门冬氨酸+L-天门冬酰胺	16.0

和天门冬酰胺则是由两种酶分别激活的。根据我们的实验结果看来(表 8),将谷氨酸和谷氨酰胺,或天门冬氨酸和天门冬酰胺一起保温时,比两者分别保温时活力的总和还要高。这不但可以肯定它们是由两种酶分别激活的,其中谷氨酰胺或天门冬酰胺的激活酶比相应的氨基酸激活酶的活力強得多;而且表明这每一对结构相似的化合物彼此之间对酶活力有相互促进的作用。

参 考 文 献

王德宝 1962 和蛋白质生物合成有关的核糖核酸 sRNA, mRNA 和核糖核蛋白体 RNA。科学通报,(9):27—41。

Allfrey, V. G. and A. E. Mirsky 1960 Amino acid transport into the cell nucleus and reactions governing nuclear protein synthesis. In: Protein Biosythesis. Ed. by Harris, R. J. C. Asymposium held at Wassenaar.

Chantrenne, H. 1961 The Biosythesis of Proteins. Pergamon Press.

Coates, M. E. and J. W. G. Porter 1959 Water-soluble vitamins, Part 11. *Ann. Rev. Biochem.*, **25**:439—66.

Davie, E. W. et al. 1956 The isolation of a tryptophan-activating enzyme from pancreas. *Arch. Biochem. Biophys.*, **65**:21—38.

Elliott, W. H. and G. Coleman 1962 A method for studying amino acid activation in crude enzyme preparations. *Biochim. Biophys. Acta*, **57**:236—44.

Finch, L. R. and L. M. Birt 1962 Amino acid activation during the pupal development of the fly, *Lucilia cuprina*. *Comp. Biochem. Physiol.*, **5**:59—64.

Heller, J. et al. 1959 Amino acid activation in relation to the synthesis of silk protein. *Acta Biochim. Polon.*, **6**:165—70.

Hierowski, M. and Z. Stolzman 1961 The effect of chloramphenicol on amino acid activation in *Escherichia coli* K-12a. *Acta Microbiol. Polon.*, **10**:135—40.

Hoagland, M. B. 1955 An enzymic mechanism for amino acid activation in animal tissues. *Biochim. Biophys. Acta*, **16**:288—89.

Howells, A. J. and L. M. Birt 1964 Amino acid-dependent pyrophosphate exchange during the life cycle of the blowfly *Lucilia cuprina*. *Comp. Biochem. Physiol.*,**11**:61—83.

Koningsberger, V. V. 1960 Studies on protein synthesis by yeast. In: Protein Biosynthesis. Ed. by Harris R. J. C. A symposium held at Wassenaar.

Loftfield, R. B. and E. A. Eigner 1959 A new assay method for amino acid activating enzymes. *J. Amer. Chem. Soc.*, **81**:4753—4.

Lowry, O. H. et al. 1950 Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, **193**:265—75.

Matsuzaki, K. 1963 The incorporation of ^{14}C-glycine into the soluble RNA of the posterior silkgland. *J. Biochem.*, **53**:326—7.

Safir, S. R. & J. H. Williams 1952 Synthesis of cyclic hydroxamic acid derivatives of pyrazine. *J. Org. Chem.*, **17**:1298—1301.

Schweet, R. S. & E. H. Allen 1958 Purification and properties of tyrosine-activating enzyme of hog pancreas. *J. Biol. Chem.*, **233**:1104—8.

Simkin, J. L. 1959 Protein biosynthesis. *Ann. Rev. Biochem.*, **28**:145—70.

Stulberg, M. P. & G. D. Novelli 1962a Amino acid-activation. Enzymes, **6**:401—32.

———— 1962b Amino acid-activating enzymes: methods of assay. In: Methods in Enzymology, **V**: 703—7.

Szafranski, P. et al. 1960 Vitamin B_{12} and the activation of amino acids. *Acta Biochim. Polon.*, **7**:3—9.

Szafranski, P. & E. Sulkowski 1959 Activation of amino acids in various organs of the guinea pig. *Acta*

Biochim. Polon., **6**:133—41.

Webster, G. C. 1959 Activation of amino acids and amides by cell-free preparations. *Arch. Biochem. Biophya.*, **82**:125—34.

Гулый, М. Ф. 1963 Биосинтез белка. Изд. А.Н. Ук. ССР.

Мосолов, В. В. и др. 1963 Превращения пептидов в присутствии препаратов «pH 5-ферментов». *Биохимия*, **28**:418—25.

Филиппович, Ю. Б. и И. Л. Никитика 1964 Свободные аминокислоты в органнизме дубового шелкопряда и их участие в обмене белков. *Биохимия*, **29**:261—7.

Шмерлинг, Ж. Г. и И. А. Басс 1962 Ферменты, активирующие аминокислоты, и акцепторные РНК в клетках Escherichia coli, Зараженных бактериофагами. *Биохимия*, **27**:502—11.

PRELIMINARY STUDIES ON THE AMINO ACID ACTIVATION IN THE ARMYWORM, *LEUCANIA SEPARATA* WALKER

CHAI CHI-HUI
(*Institute of Zoology, Academia Sinica*)

The amino acid-activating enzymes prepared from the pH 5 fraction of tissue supernatant of *Leucania separata* have been studied by the hydroxamate reaction. The pH optimum, and the effect of the variations in the incubation mixture have been investigated and the optimal conditions for enzyme reaction determined.

The activating enzymes of the armyworm were found to be inhibited by *p*-chloromercuribenzoate, and activated by ascorbic acid and reduced glutathione. These facts support the view that their active center probably contains a —SH group.

Chloramphenicol, a well-known inhibitor of protein biosynthesis, did not inhibit the amino acid activation in the armyworm. Addition of vitamin B_{12} to the incubation mixture had no effect on the activation reaction. Hence vitamin B_{12} is probably not directly involved in the activation of amino acids.

The activating enzymes reacted only with the L-isomers of the α-amino acids, and no reactions could be detected with the D-isomers and the β-amino acids. The enzymes also activated, although slightly, the dipeptides. This indicates the possibility that direct utilization of the dipeptides in protein biosythesis is carried out in the armyworm.

20 amino acids and 2 amides were incubated individually to test their activating enzymes. Among the 20 amino acids, the rate of activation of cysteine was found to be the highest. Since cytieine is a —SH compound, besides as substrate, it may also act as a protector of the activating enzyme. This may be the reason for its high activity. Glutamine and glutamic acid, and also asparagine and aspartic acid, were found to be activated by separate enzymes. Enzyme activity of the 2 amides is much stronger than those of their corresponding amino acids.

Distribution of the enzyme activity in the larval tissues and that during development have been investigated. In larvae of the last instar, the enzyme activity was highest in the fat body, the integument (together with the muscles) and the gut had a lower titer, and still lower activity was found in the hemolymph. Before pupation, enzyme activity in the fat body decreased abruptly, and the highest activity was found in the integument. During metamorphosis, the enzyme activity showed a U-shaped change. The changes in enzyme activity in the female moth were closely correlated with the ovary development and oviposition.